23551(12)

269—274

动 物 学 研 究 1996, 17 (3): 269—274 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

海南黄牛和徐闻黄牛线粒体 DNA 的多态性及其品种分化关系*

聂 龙 陈永久 王 文 宿 兵 兰 宏 张亚平
(中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室 昆明 650223)
杨关福 张细权 李加琪
(华南农业大学动物科学系 广州 510642)

S823.81

摘要 本文以 *Apa* Ⅰ、*Ava* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、*Bgl* Ⅰ、*Bgl*Ⅱ、*Dra* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Eco*RⅤ、*Hind*Ⅲ、*Hpa* Ⅰ、*Pst* Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Sca* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ等 14 种限制性内切酶分析来自海南岛的海南黄牛和雷州半岛的徐闻黄牛的线粒体 DNA 限制性片段长度多态性(mtDNA RFLP)。结果只有一种限制性内切酶(*Sal* Ⅰ)在海南黄牛中检测到多态性，并且其中的 C 型(15.0, 1.3)尚未见报道。我们的结果还显示，两个品种 6 个个体的 mtDNA 基因单倍型全部表现为 A 型，即瘤牛的血统。徐闻黄牛和海南黄牛 mtDNA 极低的遗传变异度表明两个品种的亲缘关系很近，从而在分子生物学水平为其合称为雷琼黄牛提供了佐证。

关键词 徐闻黄牛，海南黄牛，mtDNA 多态性，品种，分化

黄牛的起源、演化和分类一直受到畜牧学家的关注，并做了大量的研究工作。中国黄牛一直被中外学者认为是瘤牛（*Bos indicus*）（有肩峰）与普通牛（*Bos taurus*）（无肩峰）的混血。陈宏、邱怀等（1993）对我国一些黄牛 Y 染色体多态性的研究发现，南方黄牛在系统发育过程中受瘤牛的影响大，北方黄牛受普通牛的影响大，中原黄牛介于两者之间。陈幼春等（1990）根据 6 种血液蛋白多态性位点、体态特征和毛色等的研究认为，我国黄牛不但具有普通黄牛(*Bos taurus*)和瘤牛(*Bos indicus*)的混合血统，同时还含有位于印尼爪哇岛的巴厘牛(*Bos bangteng*)的血统，该血统主要分布在中国的岭南地区和东南沿海；另外，南方肩峰牛有可能源于与印度瘤牛不同的其他肩峰牛的祖先，而不单单是 *Bos indicus*。王毓英等（1991）在南阳牛中发现 Tf^{A1} 基因，说明我国黄牛中可能还含有非洲瘤牛的血统。

进化速度快、易于提取、较小的基因组、结构简单而稳定、在世代传递遗传过程中不会发生重组、无组织特异性、普遍地存在于真核生物以及严格的单性母系遗传方式等决定了线粒体 DNA（mtDNA）是进化和群体遗传研究的有效标记物（张亚平等，1992；Nei,1987）。目前家畜的 mtDNA 主要用于分析品种的起源、遗传分化以及亲缘关系等方

* 国家杰出青年科学基金、云南省应用基础研究重大项目基金等资助
本文 1995 年 6 月 28 日收到，同年 9 月 20 日修回

面（兰宏等，1993;Watanabe等,1985,1989;Bhat等,1990;Lan等,1993;Wang等,1994)。

Watanabe用15种限制性酶分析的9头菲律宾本地黄牛的mtDNA中，发现菲律宾本地黄牛存在2种类型的mtDNA分子。其中，5头黄牛的限制性切类型为B型，被定为菲律宾Ⅰ型。另外4头黄牛的限制性切类型为A型，被定为菲律宾Ⅱ型。从而他们认为，菲律宾黄牛是欧洲普通牛和瘤牛的混合型。菲律宾Ⅱ型起源于瘤牛的mtDNA类型，菲律宾Ⅰ型的mtDNA起源于欧洲普通牛的mtDNA类型。兰宏等（1993）用4种酶对15头云南黄牛的线粒体DNA RFLP的分析表明，其中10头为A型，即瘤牛的血统，另外5头牛为B型，即普通黄牛的血统。文际坤等（1995）用8种限制性内切酶分析云南文山牛和迪庆牛11个个体的线粒体DNA RFLP中，4个个体为A型，6个个体为B型，另1个个体的基因单倍型为前人未报道过的第3型：A-C-B-B-C-A-A（个人交流)。

分布于海南岛和雷州半岛的海南黄牛和徐闻黄牛，由于产地独特的生态地理环境和个体独特的体型外貌，是两个有代表性的中国黄牛南方品种，是研究中国黄牛起源、演化和分类不可缺少的素材。陈幼春等（1990）根据海南黄牛的Tf的F基因是世界牛种中频率出现最高的牛种(高达0.848)，认为海南可能是世界的一个牛属的发源地之一。

由于海南隔离条件较好，海南黄牛和徐闻黄牛一直被认为是两个品种。雷洲半岛原与海南岛相连，于第四纪发生断层形成琼洲海峡后两地分开，有些学者认为，两地黄牛往来频密，具有相似的生物学特征和品种特性，可合称为雷琼黄牛。杨关福等（1990）和李加琪等（1990）从毛色特征和6个血液蛋白基因频率分布有共同特征，并从15头徐闻黄牛和17头海南黄牛40个遗传座位多态座位百分比相同，平均杂合度相似等（个人交流)，为上述观点提供了佐证。

本文运用mtDNA RFLP技术首次进行海南黄牛和徐闻黄牛遗传多样性的研究，并从分子水平探讨其起源、分化和种群遗传结构等，从而为这两个品种种质资源的保存和品种改良等提供遗传学资料。

1 材料和方法

1.1 材料来源

海南黄牛和徐闻黄牛各3个个体，分别随机取自海南省琼山市道美村农户和广东省雷州市客路屠宰场。牛肾脏标本在离体24 h之内放入液氮中速冻后，取出存入-20℃的冰箱中保存备用。

1.2 试剂

限制性内切酶分别购自华美生物技术公司和德国Boehringer Mannheing公司。SDS为Servi进口分装，用时重结晶。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 mtDNA提取和纯化

参照本实验室改进的碱变性快速提取方法进行（王文等，1993)。

1.4 限制性内切酶消化

酶切反应按厂商推荐的条件进行。酶解溶液体积为20 μl，内含1μg左右的mtDNA和4—8单位限制酶，37℃消化4—8 h后，加入1／5体积的载样缓冲液(10 mmol／L Tris-HCl，0.2 mmol／L EDTA，0.15%溴酚蓝，50%甘油，pH8.0)终止反应。

1.5　琼脂糖凝胶电泳

酶解后的 DNA 片段用 0.8%琼脂糖胶(含 0.1 μg／ml 溴化乙锭)电泳分离。电极缓冲液为 Tris-硼酸(pH8.3)系统，电压 3 V／cm，时间 6—10 h。254 nm 紫外光照射下观察拍照。

1.6　数据分析方法

根据 Nei 和 Li(1979)的方法，计算各种限制性类型间的位点共享度(F)和两品种间的遗传距离(P)，并据此计算衡量群体遗传多态程度的 π 值。计算公式如下：

$F=2Nxy/(Nx+Ny)$ 式中：Nx 和 Ny 分别为两品种的限制性片段数，Nxy 为两者共享的限制性片段数。

$$P=1-\{[(F^2+8F)^{1/2}-F]/2\}^{1/r}$$

r 为限制性内切酶识别序列的碱基数，此处 $r=6$。

$$\pi_A=\sum_i^{ij} A_i A_j P_{ij}$$

式中：A_i 是第 i 种限制性类型在 A 群体中所占的分数，A_j 是第 j 种类型所占的分数，P_{ij} 是 i,j 两类型间的遗传距离。

2　结果和讨论

Apa Ⅰ、*Ava* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、*Bgl* Ⅰ、*Bgl*Ⅱ、*Dra* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Eco*RⅤ、*Hind*Ⅲ、*Hpa* Ⅰ、*Pst* Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Sca* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ等 14 种限制性内切酶将海南黄牛和徐闻黄牛的线粒体 DNA 消化成 1—7 个片段，各片段大小见表 1。结果只有一种限制性内切酶（*Sal* Ⅰ）在海南黄牛的两个个体内检测到变异，并且以前尚未作过报道。其余 13 种限制性内切酶消化产生的限制性格局在徐闻黄牛和海南黄牛中完全一致。

共检出海南黄牛限制性片段 40 个，徐闻黄牛 38 个，经计算，有差别的两种 mtDNA 基因型之间的遗传距离仅为 0.00108，衡量整个群体遗传多态程度的 π 值（与蛋白质研究中的座位平均杂合度值 H 含义相同）为 0.024%，这在所有已经用 RFLP 方法研究的家养动物品种间几乎为最小。该群体线粒体 DNA 水平遗传结构的单一，表明了它们非常近的亲缘关系。如果哺乳动物 mtDNA 的碱基突变率如 Brown(1983)建议的为每百万年 2%，则徐闻黄牛和海南黄牛的分歧大约发生在 5400 年前。

宿兵等（1995）曾对来自云南省文山州马关县和麻栗坡县的 21 匹普通马和 14 匹矮型马的分析表明，在所检测的 44 个遗传座位中，有 10 个座位发现多态性，其多态座位百分比和平均杂合度值分别为 $P=0.227$，$H=0.089$ 和 $P=0.205$，$H=0.083$，为已报道多态程度较高的家养动物。王文等（1994）则研究了云南普通家马和矮型马的 mtDNA 多态性，发现其 mtDNA 多态性程度也很高，π 值为 0.72%。从而，蛋白电泳和线粒体 DNA RFLP 的分析给出一致的结果，云南家马和矮型马在极为有限的地理范围内，表现出非常高的核内和核外基因组遗传多样性，说明其父系和母系均可能为多起源。杨关福等运用蛋白电泳技术对 15 头徐闻黄牛和 17 头海南黄牛 40 个遗传座位进行了分析，结果多态座位高达 13 个，多态座位百分比 $P=0.325$，平均杂合度值分别为 $H=0.141$ 和 $H=0.132$（个人交流），从而在蛋白质水平上显示了丰富的遗传多样性。海南黄牛和徐闻

黄牛 mtDNA 极低的变异度表明其核外基因组多态低，但核内基因组多态高，说明其母系起源可能单一，而父系则较复杂。这是一个十分有趣的现象，一方面，可能是我们用于分析的个体数较少，另一方面，可能是品种形成时，公牛和母牛的参与情况有差异。总之，对这个现象的深入研究将对黄牛的起源问题提供更为有价值的信息。

Watanabe 等(1985,1989)和 Bhat 等(1990)对牛 mtDNA 的限制性酶研究表明，普通牛(*Bos taurus*)的 mtDNA 表现为限制性 B 型，瘤牛(*Bos indicus*)则为 A 型(按照 Bhat 的标准)。我们用 14 种酶对两个品种 6 个个体 mtDNA 所作的分析表明，6 头黄牛的限制性图谱几乎完全一致。报道过出现多态的 7 种酶（包括本文的报道）在徐闻黄牛的 3 个个体和海南黄牛的 1 个个体中与菲律宾Ⅱ型完全相同，均表现为 A 型（按照 Bhat 的标准），即是 mtDNA 基因单倍型为：A-A-A-A-A-A-A，海南黄牛的另 2 个个体的基因单倍型为：A-A-A-A-A-A-C，而不含有任何一个 B 型，即普通黄牛(*Bos taurus*)的血统，从而说明这些品种的瘤牛起源，同时也说明了海南黄牛和徐闻黄牛的单一母系起源。在黄牛的 mtDNA RFLP 研究方面，国内外关于亚洲黄牛及欧洲牛品种的报道中，A 型和 B 型都有作为支配地位的比例出现，从而认为黄牛具有瘤牛起源和普通牛起源两种类型（兰宏等，1993;Watanabe 等,1985,1989;Bhat 等,1990;Lan 等,1993;Wang 等,1994），而我们所分析的两个品种的黄牛只有瘤牛的血统。由此，我们支持海南可能是世界的一个牛属的发源地之一的说法。我们的结果还从线粒体 DNA 水平支持将海南黄牛和徐闻黄牛合并为雷琼黄牛的结论。

表 1 徐闻黄牛和海南黄牛 mtDNA 限制性片段大小

Tab. 1 Restriction fragment sizes of mtDNA in Xuwen cattle and Hainan cattle

酶	限制性态型	识别位点数	限制性片段分子量(kb)
Apa Ⅰ		4	10.0 4.3 1.0 1.0
Ava Ⅰ		2	8.3 8.0
*Bam*H Ⅰ	A	4	9.8 3.2 1.9 1.4
Bgl Ⅰ		0	
*Bgl*Ⅱ	A	1	16 3
Dra Ⅰ		7	7.2 2.6 1.8 1.0 0.8 0.8 0.7
*Eco*R Ⅰ		4	6.9 4.3 4.0 1.3
*Eco*R Ⅴ		1	16.3
*Hind*Ⅲ	A	2	14.6 1.7
Hpa Ⅰ	A	5	6.0 3.3 1.8 1.6 1.5
Pst Ⅰ	A	1	16.3
Sal Ⅰ	A	1	16.3
	C	2	15.0 1.3
Sca Ⅰ	A	5	6.0 2.6 1.7 1.3 1.2
Xho Ⅰ		1	16.3

值得指出的是，文际坤等对文山牛和迪庆牛的研究中，*Ava* Ⅰ-B（8.0, 4.4, 3.8）、*Sal* Ⅰ-A（15.0, 1.3）、*Bam*H Ⅰ-C（9.1, 6.0, 1.2）、*Hpa* Ⅰ-C（13.0, 3.3）的多态为首次发现（个人交流）。本研究中，在唯一检测到多态性的限制性内切酶 *Sal* Ⅰ 中，其 C 型(15.0, 1.3)只在海南黄牛内的两个个体中出现，并且与文山牛和迪庆牛的 *Sal* Ⅰ-A 相同。线粒体 DNA RFLP 分析可以为鉴定牛种的母系起源提供有效、可靠的遗传学标记。这

些新发现的非瘤牛和普通牛的类型是否有可能代表巴厘牛等类型，显然很有必要作进一步的研究。但是，其含量甚微。看来，普通牛(*Bos taurus*)和瘤牛(*Bos indicus*)对中国黄牛的影响仍然是主流的。

新近，Loftus 等(1994)对黄牛的瘤牛-普通牛起源说提出了一些异议，他们分析 6 头欧洲牛(*Bos taurus*)、3 头印度瘤牛和 4 头非洲牛（3 头瘤牛和 1 头普通黄牛）的 mtDNA 序列的结果表明，13 头牛并不按照普通黄牛-瘤牛的形式聚类，而是按照地理位置聚类为两大系，即欧洲牛和非洲牛聚为一大系，印度牛聚为另一大系。印度牛（*Bos indicus*）作为亚洲牛的代表，Loftus 等的结果以分子生物学证据表明了亚洲瘤牛独立的驯化历史。该研究还从可被检测到的 mtDNA 序列数据揭示了在黄牛家养种中存在相当低水平的遗传多样性，我们的结果与此是一致的。

致谢　感谢本实验室刘爱华教授、林世英老师和朱春玲同志等在实验分析中所给予的帮助。

参 考 文 献

王文，施立明，1993. 一种改进的动物线粒体DNA提取方法　动物学研究，14(2)：197—198.

王毓英，曹红鹤，庞之洪等，1991. 中国部分黄牛血液蛋白多态性与其遗传关系的研究. 畜牧兽医学报，22(4)：296—302

兰宏，熊习昆，林世英等，1993. 云南黄牛和大额牛的mtDNA多态性研究. 遗传学报，20(15)：419—425.

张亚平，施立明，1992　动物线粒体DNA多态性的研究概况. 动物学研究，13(3)：289—298.

陈幼春，王毓英，曹红鹤等，1990. 中国黄牛生态种特征及其利用方向. 见：中国农业科学院畜牧研究所编. 北京：中国农业出版社，3—13.

陈宏，邱怀，詹铁生等，1993. 中国四品种黄牛性染色体多态性的研究. 遗传，15(4)：14—17.

邱怀，秦志锐，陈幼春等，1986. 中国牛品种志　见：《中国家畜家禽品种志》编委会. 上海：上海科学技术出版社.

杨关福，李加琪，张细权等，1990. 中国黄牛生态种特征及其利用方向. 见：中国农业科学院畜牧研究所编. 北京：中国农业出版社. 102—113.136—139.

宿兵，刘爱华，林世英等，1995，云南普通马矮型马蛋白多态性及其品种分化关系. 动物学研究，16(2)：126—131.

Bhat P P, Mishra B P, Bhat P N. 1990. Polymorphism of mitochondrial DNA(mtDNA) in cattle and buffalo. *Biochem. Genet.*, **28**: 311-318.

Brown W M, 1983. Evolution of Animal Mitochondrial DNA. In: Nei, M. and R K. Koehml (eds.). Evolution of Genes and Proteins. New York: Sinauer Assotiation Inc. Press. 62-88.

Lan H, Shi L M, 1993. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in southwest China: an approach from mtDNA polymorphism. *Biochem. Genet.*, **31**: 51-60.

Loftus R T, MacHugh D E, Bradley D G *et al.*, 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acade. Sci. USA*, **91**: 2757-2761.

Nei M, 1987. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press. 1-511.

Nei M, Li W-H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acade Sci USA*, **75**: 5269.

Wang W, Liu A H, Lin S Y *et al.*, 1994. Multiple genotypes of mitochondrial DNA within a horse population from a small region in Yunnan Province of China. *Biochem. Genet.*, **32**: 371-378.

Watanabe T, Masangkay J S, Wakana S *et al.* 1985. Bovine mitochondrial DNA polymorphism in restriction endonuclease cleavage patterns and location of the polymorphism sites. *Biochem. Genet.*, **23**: 947-957.

Watanabe T, Masangkay J S, Wakana S *et al.*, 1989 Mitochondrial DNA polymorphism in native philippine cattle based onrestriction endonuclease cleavage patterns *Biochem. Genet.*, **27**: 431-438.

MITOCHONDRIAL DNA POLYMORPHISM IN XUWEN YELLOW CATTLE AND HAINAN YELLOW CATTLE

Nie long Chen Yongjiu Wang Wen Su Bing Lan Hong Zhang Yaping

(*Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences Kunming*, 650223)

Yang Guanfu Zhang Xiquan Li Jiaqi

(*Department of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou*, 510642)

Abstract

Fourteen restriction endonucleases, *Apa* I, *Ava* I, *Bam*H I, *Bgl* I, *Bgl* II, *Dra* I, *Eco*R I, *Eco*R V, *Hind* III, *Hpa* I, *Pst* I, *Sal* I, *Sca* I and *Xho* I, were used to study the mtDNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) in 6 individuls of the Hainan and Xuwen yellow cattle from Hainan and Guangdong. Only (*Sal* I) out of 14 restriction enzymes disclosed mtDNA polymorphism within the Hainan yellow cattle, of which the C pattern (15.0, 1.3) has not been reported previously. The restriction patterns generated by 13 of the enzymes in Xuwen yellow cattle were identical with those in Hainan yellow cattle. The halotypes of the 6 individuals were almost A-A-A-A-A-A-A alone represented by *Bos indicus.* Our results showed monophenetic maternal origins of these two breeds of yellow cattle, and suggested that the genetic diversity within the two breeds is remarkably scarce. The low variation and monotoneous population genetic structure indicated a close relationship between the two breeds, which supported the hypothesis that Hainan yellow cattle and Xuwen cattle were from one breed named Leiqiong yellow cattle.

Key words Hainan yellow cattle, Xuwen yellow cattle, mtDNA Xolymorphism